

## **SIMBIOTSKA FIKSACIJA DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI**

### **SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION IN ORGANIC FARMING**

**Jurka Topol i Gabriella Kanižai Šarić**

#### **SAŽETAK**

U poljoprivrednoj proizvodnji dušik je vrlo često osnovni ograničavajući čimbenik rasta i razvoja biljaka, a s time i postizanja optimalnih prinosa. Najveće zalihe ovog elementa nalaze se u atmosferi, gdje je dušik u molekularnom obliku kojeg biljke nisu u mogućnosti usvojiti i iskoristiti. Nedostupan dušik iz atmosfere se kroz proces fiksacije veže u nove spojeve te na taj način postaje dostupan mikroorganizmima i biljkama da ih iskoriste za svoje metaboličke potrebe. Simbiotska fiksacija dušika najznačajnija za poljoprivrednu proizvodnju nastaje kao rezultat simbiotskih interakcija između kvržičnih bakterija i leguminoza, nakon čega slijedi infekcija i nodulacija. U kvržicama, uz prisutnost enzima nitrogenaze dolazi do procesa fiksacije dušika u kojem se atmosferski dušik prevodi u amonijak kojeg biljka dalje uključuje u svoj metabolizam te ga iskorištava za svoje raznovrsne potrebe. U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji koja je koncipirana na način da teži očuvanju prirode i okoliša, jedno od osnovnih načela je sjetva leguminoznih usjeva jer na taj način poljoprivredno tlo obogaćujemo dušikom te potičemo povećanje i održanje njegove plodnosti što u konačnici donosi mnogostruke pozitivne ekonomske i ekološke učinke.

Ključne riječi: dušik, simbiotska fiksacija dušika, kvržične bakterije, leguminoze, ekološka poljoprivredna proizvodnja

#### **ABSTRACT**

In agricultural production nitrogen is the main limiting factor for growth and development of plants and thereby also achieving optimum yield. The

largest stock of this element is in the atmosphere, where nitrogen is in a molecular form which plants are not able to uptake and use. The processes of nitrogen fixation are defined as processes in which unavailable nitrogen from the atmosphere is transformed into new compounds, and thereby becomes available to microorganisms and plants to use them for their own metabolic needs. Symbiotic nitrogen fixation which is of the greatest importance for agricultural production occurs as a result of symbiotic interactions between the plants from the family *Leguminosae* and root nodule bacteria. Symbiotic interaction begins by mutual recognition of appropriate rhizobia and legumes, followed by infection and nodulation. In the nodule, with the presence of nitrogenase enzyme, the process of nitrogen fixation occurs in which atmospheric nitrogen is transformed to ammonia which plant can include in its metabolism and use it for their various needs. In organic farming, which is designed to preserve the nature and environment, one of the basic principles is cultivation of legume crops. In this way agricultural soil is enriched with nitrogen, stimulating increase and maintenance of soil fertility which has multiple positive economic and environmental effects.

Key words: nitrogen, symbiotic nitrogen fixation, nodule bacteria, legumes, organic farming

## UVOD

Za život, biljkama je neophodna sunčeva energija, voda, te različita biljna hranjiva. Jedno od najvažnijih biljnih hranjiva je dušik jer će o njemu značajno ovisiti rast i razvoj biljaka a s time i količina i kvaliteta dobivenih prinosa. U prirodi, najveće količine dušika nalazimo u atmosferi u molekularnom obliku, ali s obzirom na činjenicu da biljke dušik mogu usvajati u samo dva oblika, a to su amonijačni i nitratni, one sav ovaj dušik iz atmosfere nisu u mogućnosti iskoristiti. Fiksacija dušika definira se kao proces vezanja molekularnog dušika u nove spojeve, čime dušik postaje raspoloživ mikroorganizmima ili biljkama. U proces simbiotske fiksacije dušika uključeni su genetski faktori kvržičnih bakterija i leguminoza u njihovom međusobnom prepoznavanju, infekciji, nodulaciji odnosno formiranju korijenovih kvržica, te odvijanju samog procesa fiksacije dušika iz atmosfere. Ovaj proces omogućuje prevođenje dušika iz molekularnog oblika u amonijačni oblik, te na taj način biljkama nedostupan dušik sada postaje dostupan te ga mogu iskoristiti za svoje različite potrebe.

Uzgoj leguminoznih usjeva ima mnogobrojne i ekonomske i ekološke pogodnosti te je iz tog razloga njihov uzgoj postao jedan od osnovnih načela na kojima se temelji ekološka poljoprivredna proizvodnja. Ekološka poljoprivredna proizvodnja, za razliku od klasične konvencionalne poljo-privredne proizvodnje, teži smanjenju negativnih posljedica na okoliš te očuvanju prirodnih bogatstava i prirode u cijelosti, čemu se značajno doprinosi i uzgojem različitih leguminoznih usjeva.

## SIMBIOTSKA FIKSACIJA DUŠIKA

Nedostatak mineralnog oblika dušika u tlu vrlo često ograničava rast biljaka, pa su se upravo zbog toga razvili simbiotski odnosi između biljaka i raznovrsnih organizama sa sposobnošću fiksiranja dušika (Freiberg i sur., 1997). Upravo najučinkovitiji fiksatori dušika uspostavljaju simbiozu s višim biljkama (Mylona i sur., 1995). Postoje različiti tipovi simbiotske fiksacije dušika koji se međusobno razlikuju prema pojedinim članovima simbiotskih odnosa, jer različite vrste bakterija stvaraju simbiotsku interakciju s različitim vrstama biljaka. Najznačajniji tip simbiotske fiksacije dušika za poljoprivredna tla je fiksacija dušika koja nastaje kao rezultat simbioze između bakterija iz rodova *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* i *Mesorhizobium* s većinom biljaka iz porodice *Leguminosae*. Ovaj tip simbioze predstavlja primarni izvor fiksiranog dušika u svim kopnenim sustavima i može osigurati više od polovice fiksiranog dušika iz bioloških izvora (Tate, 1995).

Simbiotska fiksacija dušika se inicira i održava aktivnom izmjenom kemijskih signala između biljke domaćina i bakterija tla (Fox i sur., 2007). Genetski faktori oba simbionta sudjeluju u stvaranju simbiotskog odnosa koji započinje međusobnim prepoznavanjem bakterije i biljke nakon čega slijedi infekcija biljaka bakterijama, što na kraju rezultira formiranjem kvržica na korijenovom sustavu biljaka unutar kojih će se odvijati procesi simbiotske fiksacije atmosferskog dušika. Proces fiksacije dušika zahtijeva aktivnost enzima nitrogenaze koji djeluje kao katalizator u procesu redukcije molekule dušika i njegove promjene u amonijak i osigurava za to potrebnu energiju i elektrone (Postgate, 1982). Simbiotski odnos temelji se na uzajamnoj koristi oba člana simbioze. Leguminoze kroz produkte fotosinteze opskrbljuju bakterije ugljikom odnosno energijom, dok zauzvrat bakterije opskrbljuju leguminoze dušikom uglavnom u obliku amonijaka (Howard i Rees, 1996). Struktura zrelih

kvržica, unutar kojih se odvija ova fiksacija, razvijena je kako bi udovoljila izmjeni hranjiva između oba partnera simbioze (Mylona i sur., 1995).

Pregled povijesti istraživanja biološke fiksacije dušika pokazuje da je interes uglavnom bio usmjeren na simbiotski sustav biljaka iz porodice leguminoza i rizobija zbog toga što ove asocijacije imaju najveći kvantitativni utjecaj na ciklus kruženja dušika u prirodi (Zahran, 1999). Unosi u kopnene ekosustave od biološke fiksacije dušika odnosno od simbiotskog odnosa između biljaka iz porodice leguminoza i kvržičnih bakterija iznose najmanje 70 milijuna tona dušika godišnje (Brockwell i sur., 1995). Upravo zbog toga, ovi simbiotski odnosi su od najvećeg značenja za poljoprivredu, jer omogućuju obogaćivanje poljoprivrednih tala dušikom. Učinkovita simbiotska fiksacija dušika može značajno smanjiti potrebu za umjetnim dušičnim gnojivima. Korištenje simbiotske fiksacije dušika kojom bi se smanjila ovisnost o komercijalnim dušičnim gnojivima, osim ekonomske koristi, ima koristi i za ekologiju okoliša (Fox i sur., 2007). Proizvodnja dušičnih gnojiva i njegova primjena na poljoprivredna tla, ima raznovrsne negativne posljedice za okoliš, odnosno za prirodne ekosustave. Sam proces proizvodnje dušičnih gnojiva zahtijeva korištenje neobnovljivih izvora energije čije su količine u prirodi ograničene. U ovim procesima koriste se fosilna goriva kao što su prirodni ili zemni plin i ugljen čijim korištenjem odnosno sagorijevanjem u industrijskim postrojenjima dolazi do stvaranja i oslobađanja ugljikovog dioksida. Ugljikov dioksid je jedan od najznačajnijih stakleničkih plinova i povećanje njegovih koncentracija u atmosferi dovodi do antropogenih klimatskih promjena. S druge strane, dugoročna primjena dušičnih gnojiva na poljoprivrednim tlima uzrokuje degradaciju tla, odnosno narušavanje njegovih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava, zagađenje podzemnih i nadzemnih voda te njihovu eutrofikaciju. Prema tome, proizvodnja i primjena dušičnih gnojiva je ekonomski i energetski vrlo zahtjevana i dovodi do vrlo ozbiljnih i zabrinjavajućih problema ugrožavanja prirodnih ekosustava. Simbioza između rizobija i leguminoza predstavlja jeftiniju i vrlo često učinkovitiju agronomsku praksu za osiguravanje odgovarajuće opskrbe dušikom za proizvodnju usjeva i pašnjaka temeljenih na leguminozama, nego što je to aplikacija dušičnih gnojiva. Povećanje prinosa usjeva zasađenih nakon žetve leguminoza često su jednake onima koje se očekuju nakon primjene 30 do 80 kg dušičnih gnojiva ha<sup>-1</sup> (Zahran, 1999). Korištenje simbiotske fiksacije dušika kao osnovnog izvora dušika u poljoprivrednoj proizvodnji imat će mnogobrojne pozitivne učinke te će se na

taj način izbjeći negativne posljedice proizvodnje i aplikacije dušičnih gnojiva. No ova ogromna količina morat će se još povećati sukladno s povećanjem svjetske populacije i smanjenjem prirodnih izvora potrebnih za proizvodnju dušičnih gnojiva. Ovaj će se cilj postići kroz razvoj vrhunskih sorti leguminoza, poboljšanje postojeće poljoprivredne prakse i povećanje efikasnosti samog procesa fiksiranja dušika boljim upravljanjem simbiotskih odnosa između biljaka i bakterija (Zahran, 1999).

## PROCESI PREPOZNAVANJA KVRŽIČNIH BAKTERIJA I LEGUMINOZA

Simbioza između kvržičnih bakterija i biljaka iz porodice *Leguminosae* može biti više ili manje specifična, što znači da će pojedine vrste bakterija stvarati simbiotske odnose samo s jednom ili nekoliko vrsta leguminoza. Upravo zbog toga, proces prepoznavanja je osnova za stvaranje simbiotskih odnosa. Kvržične bakterije sadrže posebne skupine gena nazvanih nodulacijski geni odnosno nod geni koji su odgovorni za stvaranje bakterijskih signalnih molekula Nod faktora, koji imaju ključnu ulogu u međusobnom prepoznavanju točno određene vrste bakterija i leguminoza. Ti geni se ispoljuju samo kod bakterija koje će stvoriti simbiotski odnos s leguminozom, dok kod slobodno živućih bakterija neće doći do njihova ispoljavanja. Iznimka tome je jedino NodD koji se ekspresionira konstitutivno odnosno prirodno (Mylona i sur., 1995). NodD ima sposobnost vezanja na specifične flavonoide koje izlučuje korijen biljke domaćina (Goethals i sur., 1992); nakon vezanja na flavonoide postaje transkripcijski aktivator drugih nod gena (Fisher i Long, 1992), koji kodiraju enzime uključene u sintezi Nod faktora (Mylona i sur., 1995). Nod faktor djeluje kao začetnik formiranja kvržica jer pokreće cijeli niz procesa za njihov razvitak i ulazak kvržičnih bakterija u korijen biljke (Long, 2001; Geurts i Bisseling, 2002; Gage, 2004). Upravo to predstavlja vrlo važnu odrednicu specifičnosti domaćina (Spaink, 2000).

Biljke leguminoze, odnosno domaćini stvaraju fitokemijske signale u obliku jedinstvene mješavine flavonoida, koji se preko korijenovog sustava otpuštaju u rizosferu. Ti fitokemijski signali imaju dvostruku funkciju, da na površinu korijena privuku kompatibilne vrste bakterija, te da odbiju neodgovarajuće i nepovoljne vrste bakterija u rizosferi odnosno u tlu. Bakterijski NodD otkriva i prepoznaje fitokemijske signale biljke, nakon čega inducira transkripciju drugih

nod gena. Proizvod transkripcije nod gena su signalne molekule Nod faktori koji zapravo predstavljaju reakciju ili odgovor bakterija na fitokemijske signale biljke. Bakterijske Nod faktore prepoznaju specijalizirani receptori na korijenu, što na samom kraju rezultira iniciranjem razvoja kvržica na korijenovom sustavu biljke domaćina. Inicijacija formiranja kvržica na korijenu kompatibilnih biljaka domaćina rezultat je molekularnog dijaloga između domaćina i bakterija (Dénarié i sur., 1993; Schultze i Kondorosi, 1998; Perret i sur., 2000; Spaiak, 2000).

Prilikom procesa prepoznavanja bakterija i leguminoza, upravo Nod faktori određuju specifičnost simbioze. Većina bakterija stvara samo nekoliko različitih Nod faktora, koji im omogućuju sposobnost stvaranja simbiotskih odnosa s ograničenim brojem vrsta leguminoza. No, neke bakterije iz roda *Rhizobium* kao npr. *Rhizobium* NGR234 imaju nešto slobodniju prirodu. Ova vrsta može nodulirati različite tropske leguminoze jer izlučuje čak 18 različitih Nod faktora. Ta produkcija različitih Nod faktora smatra se osnovom za njegov širok raspon domaćina (Price i sur., 1992).

## INFEKCIJA

Nakon procesa prepoznavanja, koji je omogućio prve interakcije i međusobno prepoznavanje odgovarajućih vrsta bakterija i leguminoza, slijedi proces infekcije. Proces infekcije reguliran je vrlo složenim kemijskim komunikacijama između odgovarajućih bakterija i leguminoza. Bakterije koloniziraju korijenov sustav leguminoza, te se pričvršćuju na njegovoj površini. Pri tome, bakterije stvaraju Nod faktore koji su od osnovne važnosti za proces infekcije jer iniciraju i reguliraju pojedine faze ovog procesa. Kod biljaka dolazi do aktiviranja skupine gena koji se nazivaju nodulacijski geni (Geurts i Bisseling 2002). Aktivacija i ekspresija tih gena je ključna jer omogućuje pokretanje reakcija i procesa u biljci koje su neophodne za uspješnu infekciju, nodulaciju pa i samu simbiotsku fiksaciju dušika. Razlikujemo rane i kasne nodulacijske gene. Rani nodulacijski geni kodiraju proizvode koji se pokazuju prije samog početka procesa fiksacije dušika, te su oni uključeni u procese infekcije i nodulacije, dok su proizvodi kasnih nodulacijskih gena uključeni u stvaranje interakcije s endosimbiontom i metaboličkoj specijalizaciji kvržica (Nap i Bisseling, 1990). Nodulacijski geni kodiraju cijeli niz različitih proizvoda nazvanih nodulini koji mogu imati i strukturnu i metaboličku

funkciju. Noduline nikada ne nalazimo kod slobodno živućih bakterija, samih bakteroida ili u korijenovom sustavu leguminoza kod kojeg nije došlo do infekcije bakterijama. S obzirom da nodulini jedino nastaju kao rezultat ispoljavanja nodulacijskih gena aktiviranih Nod faktorima bakterija, očito je kako je njihova prisutnost neophodna za stvaranje simbiotskog odnosa između bakterija i leguminoza (Nap i Bisseling, 1990; Geurts i Bisseling 2002).

Kada se bakterije pričvrste na korijen, odnosno na vrh korjenovih dlačica, dolazi do uvijanja njihovih vrhova, te na taj način bakterijske stanice ostaju zarobljene u tom dijelu (Mylona i sur., 1995). Na tom mjestu dolazi do razgradnje stanične stijenke biljne stanice (Callaham i Torrey, 1981; Van Spronsen i sur., 1994), te dolazi do uvijanja plazma membrane i nakupljanja i ugradnje novih materijala u membranu (Bauer, 1981; Newcomb, 1981; Brewin, 1991; Kijne, 1992). Ovo rezultira formiranjem potpuno nove strukture, takozvane infekcijske niti, pomoću koje bakterije ulaze u biljku (Mylona i sur., 1995). Infekcijsku nit ne stvaraju bakterije nego stanice korijena leguminoza kao reakciju na infekciju bakterijama. Infekcijska nit se prvo razvija i širi kroz stanice korijenovih dlačica nakon čega prodire u druge stanice korijena gdje se počinje granati u svim smjerovima. U stanicama korijena, koje se nalaze ispred rastuće infekcijske niti, dolazi do promjena kao što su pregrađivanje citoskeleta, premještanje jezgre i stvaranje citoplazmatskih mostova što rezultira stvaranjem takozvane preinfekcijske niti (Van Brussel i sur., 1992). Širenjem i grananjem infekcijske niti koja sadrži bakterije dolazi do širenja infekcije kroz tkiva korijena. Bakterije unutar infekcijske niti intenzivno se dijele i neprestano stvaraju Nod faktore. Ti Nod faktori potiču diobu stanica unutar korijena te na taj način dolazi do stvaranja novih struktura, kvržica na korijenovom sustavu leguminoza. Bakterije iz infekcijske niti se otpuštaju u citoplazmu biljne stanice gdje se odmah okružuju peribakteroidnom membranom koju stvara biljna stanica (Mylona i sur., 1995). Bakterije se dalje intenzivno dijele te se transformiraju u bakterioide, oblik koji ima sposobnost fiksacije atmosferskog dušika (Oke i Long, 1999). Bakteroidi zajedno s peribakteroidnom membranom koja ih okružuje nazivaju se simbiosomi (Mylona i sur., 1995).

## NODULACIJA

Nodulacija je inicirana infekcijom bakterija koje stvaraju Nod faktore a oni imaju osnovnu ulogu u procesu stvaranja kvržica. Biljna percepcija bakterijskih

Nod faktora uzrokuje brze reakcije stanica pojedinih tkiva u unutrašnjosti korijena. Nekoliko tipova stanica i tkiva moraju uskladiti svoj razvoj kako bi došlo do organogeneze kvržica (Ferguson i sur., 2010). Razvoj samih kvržica započinje kada bakterije u infekcijskoj niti stvaraju Nod faktore te se na taj način povećava njihova koncentracija. Visoka koncentracija Nod faktora dovodi do mitozne aktivacije, odnosno iniciranja diobe stanica korteksa korijena. To rezultira stvaranjem primordijalnih kvržica (Ferguson i sur., 2010). U stanicama primordijalnih kvržica dolazi do aktivacije a potom i ispoljavanja nekoliko nodulin gena koji rezultiraju stvaranjem razlika između tkiva primordijalnih kvržica i ostalog meristenskog tkiva korijena biljke (Mylona i sur., 1995). Infekcijske niti rastu kroz tkivo korijena, te kada dođu do primordijalnih kvržica počinju se granati na male ogranke. Iz tih ogranaka se u stanice primordijalnih kvržica otpuštaju bakterije koje se okružuju peribakteroidnom membranom što ju je stvorila biljka stvarajući pri tome simbiosom. Unutar stanica primordijalnih kvržica bakterije se intenzivno dijele te se transformiraju u bakterioide koje imaju sposobnost fiksacije dušika. Primordijalne kvržice se odmah zatim razviju u zrele kvržice (Mylona i sur., 1995).

Razlikujemo dva morfološka tipa kvržica kod leguminoza, determinirane i nedeterminirane. Tip kvržica koji će nastati određuje biljka domaćin (Ferguson i sur., 2010). Razlike između ova dva tipa su u pogledu prve unutrašnje diobe stanica, zadržavanje meristemske regije te formacije zrele kvržice (Newcomb i sur., 1979; Gresshoff i Delves, 1986; Rolf i Gresshoff, 1988.). Kod nedeterminiranih kvržica, prva dioba stanica se odvija u unutrašnjosti mezoderme nakon čega slijedi dioba stanica u endodermu i periciklu, one sadrže mnogo trajnog meristema te zrele kvržice imaju više cilindričan oblik (Ferguson i sur., 2010). Za razliku od toga, kod determiniranih kvržica prva dioba stanica se odvija odmah ispod epiderme u vanjskom dijelu mezoderme, ne sadrže trajni meristem i zrele kvržice su više okruglastog oblika (Ferguson i sur., 2010).

## KARAKTERISTIKE KVRŽICA

Proces nodulacije završava stvaranjem kvržica na korijenovom sustavu leguminoza unutar kojih se odvija proces fiksacije atmosferskog dušika. Na poljima, male kvržice postaju vidljive 2-3 tjedna nakon sjetve, ovisno o vrsti leguminoze i uvjeta za klijanje i nicanje (Lindemann i Glover, 2003). Na početku razvoja, kvržice su sitne, iznutra bijele do sive boje što upućuje na



činjenicu da fiksacija dušika još nije započela. S vremenom, kvržice postaju sve krupnije a iznutra mijenjaju boju u ružičastu ili crvenu te je to pouzdan znak da je fiksacija dušika započela.

Općenito, leguminoze možemo podijeliti na jednogodišnje i višegodišnje vrste, pa zbog toga postoje razlike između kvržica na jednogodišnjim i višegodišnjim leguminozama. Kvržice na višegodišnjim leguminozama manjih su dimenzija, nepravilnog oblika, većinom smještene na glavnom korijenu biljke. Kvržice višegodišnjih leguminoza su dugoživeće i fiksirat će dušik tijekom cijele sezone rasta, sve dok su uvjeti za to povoljni (Lindemann i Glover, 2003). Za razliku od toga, kvržice na jednogodišnjim leguminozama su većih dimenzija, okruglog oblika, raspoređene po cijelom korijenu biljke. Kvržice jednogodišnjih leguminoza su kratko živeće tako da će se neprestano izmjenjivati tijekom cijele sezone rasta (Lindemann i Glover, 2003). Kvržice leguminoza koje više ne fiksiraju atmosferski dušik, postepeno mijenjaju boju u zelenkastu nakon čega ih biljka čak može odbaciti. U sredini sezone rasta na korijenu leguminoze trebale bi dominirati kvržice koje su na presjeku ružičaste ili crvene boje. No ako dominiraju bijele, sive ili zelene kvržice, fiksacija dušika je slaba, što može biti rezultat infekcije i nodulacije s neučinkovitim sojem kvržičnih bakterija, nedovoljne ishrane biljke, razvoja mahune ili nekog drugog uzroka stresa biljke (Lindemann i Glover, 2003).

Kod zrelih kvržica od osnovne važnosti je njihova građa jer je upravo ona odgovorna za osiguravanje točno određenih uvjeta koji omogućuju nesmetano odvijanje procesa fiksacije molekularnog dušika. Kod leguminoza, u svakoj zreloj kvržici nalazi se peribakteroidna membrana stvorena od biljke koja okružuje unutarstaničnog mikrosimbionta, odnosno bakterioide koji u stanicama kvržica fiksiraju atmosferski dušik. Ova membrana nastaje od plazma membrane domaćina odnosno biljke leguminoze. Peribakteroidna membrana kvržica leguminoza sadrži fosfolipide i proteine organizirane drugačije nego kod plazma membrane (Perotto i sur., 1995; Verma, 1992), uz to mogu i sadržavati različite noduline biljaka i proteine bakterija (Fortin i sur., 1985; Miao i sur., 1992), te se pretpostavlja da im upravo to omogućuje neka nova specijalizirana svojstva i funkcije (Mylona i sur., 1995). Peribakteroidne membrane kvržica imaju višestruku ulogu i one su odgovorne za stvaranje uvjeta koji su potrebni za odvijanje procesa fiksacije dušika. Peribakteroidne membrane stvaraju granicu ali i poveznicu između simbiotskih partnera preko

koje se izmjenjuju signali i metaboliti, te sprečavaju obrambenu reakciju biljke na unutarstanične bakterije (Nap i Bisseling, 1990; Verma, 1992; Werner, 1992). Nadalje sudjeluju u stvaranju anaerobnih uvjeta u unutrašnjosti kvržica koji su neophodni za proces fiksacije dušika. Naime, enzim nitrogenaza koji je ključan u ovom procesu izuzetno je osjetljiv na kisik jer se u njegovoj prisutnosti ireverzibilno inaktivira. Peribakteroidne membrane također sudjeluju u sprečavanju nastanka obrambenih reakcija domaćina biljke leguminoze na prisutnost bakterija u kvržicama. Upravo je na taj način ovaj simbiotski odnos uopće moguć.

## ZNAČAJ I PRIMJENA SIMBIOTSKE FIKSACIJE DUŠIKA U EKOLOŠKOJ POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Sjetva leguminoznih usjeva ima mnogostruke povoljne učinke za poljoprivredna tla. Na ovaj način se veže atmosferski dušik, koji se odmah koristi za sintezu bjelancevina i sprječava se opasnost od onečišćenja podzemnih voda nitratima koji se inače javljaju kod intenzivne primjene mineralnih dušičnih gnojiva (Štafa i sur., 1999). Tlo se obogaćuje organskom tvari što ima višestruke pozitivne učinke na poboljšanje i održanje povoljnih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava tla. Održava se plodnost tla i omogućuje kulturama koje slijede u plodoredu korištenje biološki vezanog atmosferskog dušika (Štafa i sur., 1999). Upravo iz tog razloga preporuča se da različiti leguminozni usjevi postanu neizostavni prilikom kreiranja svakog dobrog plodoreda. Nadalje, uzgojem leguminoznih usjeva smanjuje se količina organskih gnojiva bogatih dušikom koje treba aplicirati. U pravilu njih nije potrebno gnojiti izuzev samo manjim količinama na početku njihove vegetacije za početni rast i razvoj sve dok one ne formiraju korijenove kvržice i dok ne počne proces fiksacije dušika. Osim što se simbiotskom fiksacijom dušika osiguravaju biljkama dovoljne količine dušičnog hranjiva u potpunosti se udovoljava zahtjevima gospodarenja tlom kao što su: produktivnost, sigurnost, zaštita prirodnih resursa, ekonomičnost (Redžepović i sur., 2007). Leguminozni usjevi obuhvaćaju velik broj raznovidnih vrsta koje se međusobno razlikuju po vremenu sjetve i trajanju vegetacije tako da postoji širok raspon mogućnosti njihovog uključivanja u svaki plodored. Leguminoze se mogu uključiti u plodored kao predusjev koji se sije prije glavne kulture, kao naknadni usjev koji se sije nakon glavne kulture ili čak kao međusjev koji se sije između vegetacijskog perioda glavnih kultura. Osim toga, neki leguminozni usjevi se

moгу uzgajati i u kombinaciji s glavnim usjevom. U ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji se upravo zbog tako velike raznolikosti leguminoznih usjeva one mogu uključiti u svaki dobro osmišljeni i organizirani plodored.

Prilikom uzgoja leguminoza primjenom bakterizacije možemo povećati učinkovitost procesa simbiotske fiksacije dušika te na taj način povećati i količinu fiksiranog dušika što na samom kraju rezultira i povećanjem njihovog prinosa. Bakterizacija predstavlja vrlo učinkovitu metodu kojom se efikasni sojevi kvržičnih bakterija uvođe u tlo odnosno u rizosferu (Deaker i sur., 2004). Cilj bakterizacije je osigurati dovoljan broj učinkovitih kvržičnih bakterija koje bi omogućile brzu kolonizacije rizosfere omogućavajući da infekcija i nodulacija započnu čim prije nakon klijanja i nicanja, što u konačnici rezultira ostvarivanjem optimalnih prinosa (Thompson, 1988; Catroux, 1991). Potreba za bakterizacijom visokim brojem učinkovitih bakterija postoji kako bi se na taj način nadmašila kompeticija s populacijama neučinkovitih sojeva bakterija u tlu ili kako bi se povećala populacija učinkovitih bakterija na tlima čiji su uvjeti limitirali njihov opstanak (Deaker i sur., 2004). Počeci razvoja bakterizacije vezani su s otkrićima da se proces fiksacije dušika odvija u korijenovim kvržicama. Znanstvenici su nakon toga prepoznali mnogo više specifičnu vezu između određenih sojeva bakterija i određenih vrsta leguminoza u kontekstu infektivnosti (mogućnosti infekcije i noduliranja) i efektivnosti (sposobnosti fiksiranja atmosferskog N<sub>2</sub>) (Deaker i sur., 2004).

Daljnji pravci istraživanja usmjerena su na proučavanje prirodnih populacija simbioznih fiksatora dušika (Vasquez-Arroyo i sur. 1998; Sikora i sur., 2002; Sikora i sur., 2008) kao i na selekciju učinkovitih sojeva te iznalaženje najkvalitetnije simbiozne zajednice sorta x soj (Redžepović i sur., 1991; Sikora i Redžepović, 2000; Sikora i sur., 2008). Identifikacija i selekcija najučinkovitijih sojeva važna je zbog njihovog iskorištavanja u pripremi komercijalnog preparata za bakterizaciju jer uvođenjem najučinkovitijih sojeva, koji su istovremeno prilagođeni uvjetima određenog proizvodnog područja moći će se poboljšati kvalitet inokuluma što ima za posljedicu veće iskorištavanje procesa simbiotske fiksacije dušika (Sikora i Redžepović, 2000). Maksimalnim iskorištavanjem prirodnog procesa simbiotske fiksacije dušika povećala bi se proizvodnja proteina u zrnju leguminoza, smanjili troškovi proizvodnje, a potrošaču ponudili jeftiniji i s gledišta prehrane, biološki vredniji proizvod (Sikora i Redžepović, 2000; Redžepović i sur., 2007). Istraživanja su bila

usmjerena i na razvoj različitih metoda primjene preparata za bakterizaciju putem bakterizacije sjemena zaprašivanjem, peletiranjem, impregniranjem ili bakterizacije tla putem tekućih ili granuliranih sredstava (Deaker i sur., 2004). Komercijalni preparati za bakterizaciju kao nosač bakterijskih stanica najčešće upotrebljavaju treset zbog visokog sadržaja organske tvari, optimalnog kemijskog sastava i dobrog kapaciteta zadržavanja vode (Stephens i Rask, 2000; Deaker i sur. 2004). Međutim ispituju se svojstva i drugih nosača kao što su mineralna tla, glina, kompostirani biljni materijal, perlit i dr. (Stephens i Rask, 2000).

U nekim državama su uspostavljene službe za kontrolu preparata za bakterizaciju, poduprte zakonima i propisima (Deaker i sur., 2004). Mnogobrojna poboljšanja samih preparata osigurala su optimiziranje uvjeta proizvodnje i održavanje kvalitete proizvoda. No zbog manjka kontrole postupka bakterizacije, unatoč uvijek prisutnim preporukama proizvođača koje se odnose na čuvanje i aplikaciju preparata za bakterizaciju, puni potencijal proizvoda visoke kvalitete nije uvijek postignut (Deaker i sur., 2004). U Republici Hrvatskoj predstjetvena bakterizacija sjemena soje visokoučinkovitim sojevima *B. japonicum* je preporučena redovna mjera u proizvodnji ove leguminoze (Sikora i Redžepović, 2000; Milaković i sur, 2012). Nadalje, istraživanja Kanižai i sur. (2007) su potvrdila kako predstjetvena bakterizacija sjemena lucerne u ekološkom uzgoju utječe na veći prinos zelene mase, suhe tvari i bjelančevina u odnosu na nebakteriziranu varijantu. Ista skupina autora (2007) je utvrdila kako djelotvornost simbioze između krmne galege (*Galega orientalis* Lam.) i *R. galegae* u ekološkom uzgoju značajno utječe na težinu i dinamiku rasta nadzemnih dijelova biljke i akumulaciju esencijalnih makroelemenata u biljci, prouzročene bakterizacijom.

Također, utvrđeno je kako primjena selekcioniranih sojeva *B. japonicum* i biostimulatora značajno utječe na povećanje sadržaja dušika u cijeloj biljci i stabiljici soje (Redžepović i sur., 2007). Djelotvornost pripravaka za predstjetvenu bakterizaciju sjemena može se poboljšati dodatkom različitih adhezivnih sredstava. Primjenom lakopristupačnih tvari koje imaju svojstva adheziva, poput šećera, u sklopu predstjetvene bakterizacije sjemena soje povećava se broj i masa suhe tvari kvržica po biljci, broj mahuna, masa 1000 zrna a samim time i prinos soje (Milaković i sur, 2012).

## ZAKLJUČAK

Ekološka poljoprivredna proizvodnja temelji se na nekoliko osnovnih načela kojima se nastoji minimalizirati negativan utjecaj poljoprivredne proizvodnje na okoliš te potaknuti njegovo očuvanje. Iznimnu važnost imaju raznolike biljke iz porodice *Leguminosae* koje imaju sposobnost stvaranja simbiotskih odnosa s kvržičnim bakterijama. Na ovaj je način omogućen proces pretvorbe dušika iz biljkama nedostupnog oblika u dostupan oblik tako da ga biljka može uključiti u svoj metabolizam i iskoristiti za svoje potrebe. Osim toga leguminozni usjevi obogaćuju tlo dušikom i organskom tvari, te na taj način potiču poboljšavanje i održavanje povoljnih fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstava tla što direktno utječu na plodnost tla neophodnu za ostvarivanje optimalnih prinosa.

## LITERATURA

1. Bauer, W. D. (1981): Infection of legumes by rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 407-449.
2. Brewin, N. J. (1991): Development of the legume root nodule. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 191-226.
3. Brockwell, J., Bottomley, P. J., Thies, J. E. (1995): Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* 174:143-180.
4. Burns, R. C., Hardy, R.W.F. (1975): Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York.
5. Burris, R. H. (1994): Biological nitrogen fixation—past and future, p. 1-11. In Hegazi N. A., Fayez M., Monib M. (ed.), Nitrogen fixation with nonlegumes. The American University in Cairo Press, Cairo, Egypt.
6. Callaham, D. A., Torrey, J. G. (1981): The structural basis of infection of root hairs of *Trifolium repens* by *Rhizobium*. *Can. J. Bot.* 59: 1647-1664.
7. Catroux, G. (1991): Inoculant quality standards and controls in France. In: Thompson J.A., (ed.), Expert Consultation on Legume Inoculant Production and Quality Control, FAO, Rome, 113-120.
8. Deaker, R., Roughley, R. J., Kennedy, I. R. (2004): Legume seed inoculation technology- a review, *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1275-1288

9. Dénarié, J., Debellé, F., Truchet, G., Promé, J. C. (1993): Rhizobium and legume nodulation: A molecular dialogue. In: Palacios R., Mora J., Newton W. E. (eds.), New horizons in nitrogen fixation. Kluwer, Dordrecht, 19–30.
10. Dixon, R. O. D., Wheeler, C. T. (1986): Nitrogen fixation in plants. Blackie, Glasgow, United Kingdom.
11. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (1990): Fertilizer yearbook, 39. Rome, Italy.
12. Ferguson, B. J., Indrasumunar A., Hayashi, S., Meng-Han Lin, Yu-Hsiang Lin, Reid, D. E., Gresshoff, P. M. (2010): Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. Invited Expert Review Journal of Integrative Plant Biology, 52 (1): 61–76.
13. Fisher, R. F., Long, S. R. (1992): *Rhizobium*-plant signal exchange. Nature 357, 655–660.
14. Fortin, M. G., Zechelowska M., Verma, D. P. S. (1985): Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules. EMBO J. 4, 3041–3046.
15. Fox, J. E., Gullledge, J., Engelhaupt, E., Burow, M. E., McLachlan, J. A. (2007): Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America 104: 10282–10287.
16. Franche, C., Lindström, K., Elmerich, C. (2009): Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant Soil 321: 35–59.
17. Freiberg, C., Fellay, R., Bairoch, A., Broughton, W. J., Rosenthal A., Perret X. (1997): Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. Nature 387: 394–401.
18. Gage, D. J. (2004): Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 280–300.
19. Geurts R., Bisseling T. (2002): Rhizobium nod factor perception and signalling. Plant Cell 14 (Suppl): S239–S249.
20. Goethals, K., Van Montagu M., Holsters M. (1992): Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveals a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 1646–1650.

21. Gresshoff, P. M., Delves A. C. (1986): Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: Blonstein A. D., King P. J., (eds.), Plant Gene Research III. A Genetical Approach to Plant Biochemistry. Springer Verlag, Wien. 159–206.
22. Howard, J. B., Rees D. C. (1996): Structural basis of biological nitrogen fixation, Chem. Rev. 96: 2965–2982.
23. Kanižai, G., Milaković, Z., Šeput, M., Bukvić, Ž., Kralik, D. (2007): Effect of lucerne seed bacterization (*Medicago sativa* L.) on yield components in ecological cultivation. Cereal Research Communications, 35: 577-580.
24. Kijne, J. W. (1992): The *Rhizobium* infection process. In: Biological Nitrogen Fixation, Stacey G., Burris R. H. , Evans H. J., (eds.), New York: Chapman and Hall, 349-398.
25. Lindemann, W. C., Glover C. R. (2003): Nitrogen Fixation by Legumes, Guide A-129, College of Agriculture and Home Economics.
26. Long, S. R. (2001): Gene and signals in the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Physiol 125: 69–72.
27. Miao, G. H., Hong, Z., Verma, D.P.S. (1992): Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. J. Cell Biol. 118: 481-490.
28. Milaković, Z., Bukvić, Ž., Kanižai, G., Šeput, M., Miloš, S. (2007): Symbiotic efficiency of fodder galega (*Galega orientalis* Lam.) and *Rhizobium galegae*. Cereal Research Communications, 35: 1333-1336.
29. Milaković, Z., Kanižai Šarić, G., Veselovac, I., Kalajžić, I. J. (2012): Djelotvornost adhezivnih sredstava u predstjetvenoj bakterizaciji sjemena soje. Poljoprivreda, 18 (1): 19-23.
30. Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T. (1995): Symbiotic Nitrogen Fixation. The Plant Cell. Vol. 7: 869-885. American Society of Plant Physiologists.
31. Nap, J. P., Bisselng, T. (1990): Developmental biology of a plantprokaryote symbiosis: The legume root nodule. Science 250: 948-954.
32. Newcomb, W. (1981): Nodule morphogenesis and differentiation. In: Biology of the *Rhizobiaceae*, Giles K. L., Atherly A. G. (eds.), New York: Academic Press, 247-297.
33. Oke, V., Long S. R. (1999): Bacteroid formation in the *Rhizobium*–legume symbiosis, Current Opinion in Microbiology, 2: 641–646.

34. Paul, E. A. (1988): Towards the year 2000: directions for future nitrogen research, p. 417–425. In Wilson J. R. (ed.), *Advances in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
35. Peoples, M. B., Herridge, D. F., Ladha, J. K. (1995): Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174: 3–28.
36. Perotto, S., Donovan, N., Droback, B. K., Brewin, N. J. (1995): Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development. *MOI. Plant-Microbe Interact.* In press.
37. Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. J. (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180–201.
38. Postgate, J. R. (1982): Biological nitrogen fixation: fundamentals, *Philos. Trans. R. Soc. B* 296: 387–375.
39. Price, N. P. J., Relle, E., Talmont, F., Lewin A., Promb D., Pueppke S. G., Mallet F., Dbnarlb J., Promb J. C., Broughton, W. J. (1992): Broad-host-range *Rhizobium* species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated. *MOI. Microbiol.* 6: 3575-3584.
40. Redžepović S., Sikora S., Sertić Đ., Manitašević J., Šoškić M., Klaić Ž. (1991): Utjecaj fungicida i gnojidbe mineralnim dušikom na bakterizaciju i prinos soje. *Znan. Prak. Poljop. Tehnol.* 21: 43-49.
41. Redžepović, S., Čolo, J., Blažinkov, M., Sikora, S., Pecina, M., Duraković, L. (2007): Utjecaj biostimulatora rasta i fungicida za tretiranje sjemena soje na učinkovitost simbiotske fiksacije dušika. *Sjemenarstvo* 24:169-176.
42. Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M. (1988): Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 297–319
43. Schultze, M., Kondorosi, A. (1998): Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32: 33–57
44. Sikora, S., Redžepović, S. (2000): Identification of Indigenous *Bradyrhizobium japonicum* Strains Isolated from Different Soil Types in Western Slavonia. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 65 (4): 229-236.
45. Sikora, S., Redžepović, S., Bradić, M. (2002): Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. *Microbiological Research* 157: 213-219.



46. Sikora, S., Blažinkov, M., Babić, K., Sudarić, A., Redžepović, S. (2008): Symbiotic nitrogen fixation and sustainable soybean production. *Cereal research communications* 36: 1483-1486
47. Spaink, H. P. (2000): Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 257–288.
48. Sprent, J. I., Sprent, P. (1990): Nitrogen fixing organisms. Pure and applied aspects. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
49. Stephens, J.H.G., Rask, H.M. (2000): Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* 65: 249-258
50. Štafa, Z., Redžepović, S., Grbeša, D., Uher, D., Maćešić, D., Leto, J. (1999): Effect of Inoculation and Top-Dressing with KAN on Yields and Characteristics of Winter Peas in Wheat Mixture *Agriculturae Conspectus Scientificus* 64: 211-222.
51. Tate, R. L. (1995): Soil microbiology. Symbiotic nitrogen fixation, 307–333. John Wiley & Sons, Inc., New York.
52. Thompson, J. A. (1988): Survival of root-nodule bacteria on inoculated seed. In: Murrell, W. G., Kennedy I.R. (eds.), *Microbiology in Action, Research Studies Press, Letchworth*, 67–80.
53. Van Brussel, A. A. N., Bakhuizen, R., Van Spronsen, P. C., Spaink, H. P., Tak, T., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. (1992): Induction of preinfection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipooligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257: 70-72.
54. Van Spronsen, P. C., Bakhuizen, R., Van Brussel, A. A. N., Kijne, J. W. (1994): Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a twostep process. *Eur. J. Cell Biol.* 64: 88-94.
55. Vasquez-Arroyo, J., Sessistsch, A., Martinez, E., Peña-Cabriaes, J.J. (1998): Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 204, 147–154.
56. Verma, D. P. S. (1992): Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* 4: 373-382.
57. Werner, D. (1992): Physiology of nitrogen-fixing legume nodules: Compartments and functions. In: *Biological Nitrogen Fixation*, Stacey G., Burris R. H., Evans H. J., (eds.), New York: Chapman and Hall, 399-431.

58. Zahran, H. H. (1999): *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate, Microbiology and molecular biology reviews, 63: 968–989.
59. Zahran, H. H., Ahmed, M. S., Afkar, E. A. (1995): Isolation and characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic bacteria from saline soils of Egypt. J. Basic Microbiol. 35: 269–275.
60. Znaor, D. (1996): Ekološka poljoprivreda, Nakladni zavod Globus, Zagreb.

**Adrese autora – Author's addresses:**

Jurka Topol, mag.ing.agr.  
Superna d.o.o.  
Radnička 15  
Savska Ves, 40 000 Čakovec

**Primljeno – Received:**

11. 04. 2013.

doc.dr.sc. Gabriella Kanižai Šarić  
e-mail: gkanizai@pfos.hr  
Poljoprivredni fakultet Sveučilišta u Osijeku,  
Kralja Petra Svačića 1d, 31000 Osijek